

## 時分割・元素識別可能な 3 次元分析X線顕微鏡の開発

著者	青木 貞雄
発行年	2010
その他のタイトル	Development of Time-resolvable and Element-distinguishable Three-dimensional Analytical X-ray Microscope
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/107672">http://hdl.handle.net/2241/107672</a>

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19206010

研究課題名（和文）時分割・元素識別可能な 3 次元分析 X 線顕微鏡の開発

研究課題名（英文）Development of Time-resolvable and Element-distinguishable  
Three-dimensional Analytical X-ray Microscope

研究代表者

青木 貞雄（AOKI SADA0）

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・教授

研究者番号：50016804

研究成果の概要（和文）：放射光とレーザープラズマ X 線を用いた X 線位相コントラスト顕微鏡と蛍光 X 線顕微鏡を構築した。X 線位相コントラスト顕微鏡の対物素子としては主としてゾーンプレートを用い、蛍光 X 線顕微鏡には主としてウオルターミラーを用いた。多方向から撮影した X 線顕微鏡像を利用して 3 次元の X 線位相コントラスト像と蛍光 X 線像を再構成した。蛍光 X 線像からは元素識別可能な像が得られ、硫酸銅の電気分解において銅の析出変化の様子が観察できた。加えて、3 次元元素マッピングも可能になった。3 次元試料として植物の種子、赤血球、藻、ダイヤモンドなどを観察した。

研究成果の概要（英文）：X-ray phase contrast and X-ray fluorescence microscopes have been constructed with synchrotron radiation or laser plasma X-rays. Zone plates were mainly used for the X-ray phase contrast microscope and Wolter mirrors for the X-ray fluorescence microscope. Three dimensional X-ray phase contrast and X-ray fluorescence images were reconstructed from multi-directional projection or X-ray fluorescence images. Time-lapse observation of electrolysis of copper sulfate was made with a full-field X-ray fluorescence imaging microscope. Three dimensional element mapping became possible with X-ray fluorescence images. Several specimens such as plant seeds, red blood cells, diatoms and diamonds were three dimensionally observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	19,800,000	5,940,000	25,740,000
2008 年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総 計	37,000,000	11,100,000	48,100,000

研究分野：X 線光学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎、応用光学・量子光工学

キーワード：X 線顕微鏡、蛍光 X 線、3 次元、元素分析、位相コントラスト、時分割、放射光、レーザープラズマ

## 1. 研究開始当初の背景

X線は電子線より透過力が大きく、可視光より波長が短いと言う特性に加え、元素識別能も有している。これらの特徴を生かしたX線顕微鏡の開発が放射光施設で進められてきた。我々のグループでは、X線の全反射現象を利用したウォルターミラーを用いた軟X線顕微鏡（波長3nm前後）を開発し、ミラーを用いた結像系としては世界で初めて50nmの分解能を得ることに成功していた。世界の軟X線顕微鏡は、ゾーンプレートと放射光の組み合わせが主流で、分解能は30nm～50nmに達していた。米国のブルックヘブンNSLS放射光施設、パークレーのALS放射光施設、ドイツ、ベルリンのBESSY II 放射光施設の開発が先行し、日本では立命館大学の放射光施設AURORAで開発が進められていた。

一方、硬X線（波長0.1nm～0.2nm）の蛍光X線顕微鏡は、すべて放射光光源を利用していた。代表的なものには、ゾーンプレートやカークパトリック・バエズミラー（KBミラー）などを利用した走査型蛍光X線顕微鏡があり、実用的な分解能のレベルは100nmに迫っていた。これらの光学素子の開口数は、0.001前後と極めて小さく、有効視野が狭いため、発散光である蛍光X線を直接拡大結像する結像型蛍光X線顕微鏡の実現は難しかった。

結像型蛍光X線顕微鏡は、空間的に広がりのある対象物でも同一時刻に像として捉えられ、時間的に変化する現象の観察に適している。本タイプのX線顕微鏡は世界的にも我々が先行し、高エネルギー加速器研究機構(KEK)放射光施設で開発を進めて来た。蛍光X線結像用には、比較的開口数の大きい（～0.03）ウォルターミラーを利用して来た。このミラーを利用した蛍光X線顕微鏡像から植物種子中の3次元元素マッピングも可能になりつつあった。生物試料観察

は、試料育成など比較的長期間にわたる作業や繰り返し測定することが多く、大型放射光施設での研究に馴染まないものもある。そのような問題を解決するためには、同程度かそれ以上の機能を有する実験室系の結像型の蛍光X線顕微鏡の実現が望まれた。

以上のような基礎的なデータを基にして、本研究では、実験室系で位相コントラストと蛍光X線を画像信号とするX線顕微鏡を併設し、3次元分析X線顕微鏡の開発を行うことにした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、位相差X線顕微鏡と蛍光X線顕微鏡を組み合わせ、分析X線顕微鏡を作成し、短波長軟X線領域（波長3nm付近から0.2nm前後）にて試料を観察し、加えて元素マッピングができる実験室系のシステムを開発することである。光源には、基礎データ収集用として放射光を利用し、位相差用としてレーザープラズマ軟X線源、蛍光X線用光源として電子線励起X線源を用いる。本研究で開発する波長域には、軽元素の炭素、窒素、酸素や鉄、銅、亜鉛などの主要金属元素の吸収端と蛍光X線のスペクトルが存在する。これらの元素を含む試料の透過像および蛍光X線像から3次元元素マッピングを試みる。

本研究では、これらの画像データの日常的な収集を可能にするために、当該波長域のプラズマ軟X線源を開発し、集光効率の良いウォルターミラーを設計・製作し、実験室系の分析X線顕微鏡システムを構築する。

## 3. 研究の方法

本研究では、位相差X線顕微鏡と蛍光X線顕微鏡を併設した実験室系3次元分析X線顕微鏡を組み立て、試料観察と元素マッピングシステムを構築する。

### (1) 短波長X線用ウォルターミラーの製作

ウォルターミラーは、X線の全反射を利用するために通常の球面ミラーとは異なり、内径が10mm前後、長さが40mm前後の非球面でパイプ状内面を反射面として利用する。形状の制約から直接研磨加工することが困難なために、本研究では、ミラーと同じ形状の凸面棒状母材を研磨加工し、そのレプリカをミラーとして使用する。ミラーの材料には膨張係数や硬さの観点からパイレックスガラスを用いるが、短波長X線の反射率を向上させるために反射面に金属を蒸着する。

X線用ウォルターミラーは、母材の研削・研磨、パイレックスガラス製の真空成型レプリカ、および内面への金属蒸着、によって作製する。

### (2) 短波長パルスX線の生成

レーザープラズマX線の短波長化は、励起Nd-YAGパルスレーザーのパルス幅を従来の8ナノ秒から100ピコ秒以下に短くすることによって実現する。これまで利用して来た軟X線波長域は3nm前後であったが、今回は0.5nm付近まで短波長化する。プラズマX線の短波長化は、パルスレーザーのピークパワー ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) に依存する。今回導入のパルスレーザーは $\sim 10^{13} \text{W}/\text{cm}^2$ となり、これまでより1桁以上のピーク出力があり、ニオブウムターゲットにより0.6nm付近の短波長X線の発生が可能になる。

### (3) 軟X線位相差顕微鏡光学系の構築

ウォルターミラーは、原理的にはその双曲面と楕円面の焦点の位置で決まる定まった物点と像点を持つが、光学系の途中では物体を透過した光は直接光(0次光)と回折光に分かれて伝播する。物体を照明するX線の光束を限ると対物ミラー後方では回折光が直接光に比べて

広がる。直接光の光束の大きさに相当する位相板を挿入することによって直接光の位相を $\lambda/4$ ずらすと、試料によるX線の位相変化を検出器面上で強度変化に変換することができる。このような位相差光学系を用いると、吸収の少ない試料でも高い像コントラストで観察することができる。

### (4) 時間分割蛍光X線顕微鏡の構築

結像型のX線顕微鏡では、時間的に変化する対象物を経過観察ができる。特定位置における特定元素量の時間変化を観察するための基礎実験として、放射光を利用した蛍光X線顕微鏡を構築する。

### (5) 蛍光X線ホトンカウンティングと3次元画像再構成

結像された蛍光X線像の元素分布(エネルギー分布)を得るために、CCDのピクセル(画素)がX線のエネルギーを計測できるように工夫する。1個ずつX線(ホトン)をカウントできるような低線量下では、CCDの各ピクセルがそのX線のエネルギーを同定できるようになる。すなわち、蛍光X線がピクセルに入射すると、そのX線エネルギー $E_i$  (eV)を検出部Siの電子/正孔対生成エネルギー $E_e$  (3.65eV)で割った値( $E_i/E_e$ )に比例した出力として得られる。リン(2keV)の場合はこの値は548に相当する。ひとつの画面で各ピクセル最大1個のX線を数えるので、1ピクセルあたりの1ホトン入力計測で時間が決まる。1ピクセル当たり2ホトン以上の入力は誤差要因になる。この様な画面を500から1000枚重ね合わせて、蛍光X線エネルギー分布画像を得る。

3次元画像再構成は、多方向から撮影した2次元画像をトモグラフィのアルゴリズムを利用して行う。

#### (6) 生物試料の観察

リンを含む細胞中の核酸分布を確認するために、可視の蛍光顕微鏡を補助的にX線顕微鏡光学系に導入し、双方の画像から核酸分布を求める。

### 4. 研究成果

#### (1) 短波長X線用ウォルターミラーの製作

X線用ウォルターミラーは母材(タングステンカーバイド)の研削・研磨、真空成型レプリカ(パイレックスガラス)、白金の内面蒸着、によって作製した。白金蒸着は短波長のX線を効率よく反射させるために行った。パイプ状(内径10mm前後)のミラー内面への蒸着はタングステンヘヤピンフィラメントに白金細線を巻き付けることによって実現した。蒸着面の平均粗さ約1.3nmが達成され、斜入射角7mradで波長0.5nmのX線に対して反射可能なコーティングができた。

#### (2) 短波長パルスX線の生成

レーザープラズマX線の短波長化は、パルス幅100ピコ秒Nd-YAGレーザーによって実現した。板状ターゲットにレーザーを集光照射し、透過回折格子(5000line/mm)によって分光した。モリブデンでは0.45nm近辺、ニオブウムでは0.5nm近辺、ジルコニウムでは0.55nm近辺のプラズマX線が得られた。これらの波長群は硫黄の吸収端(0.50nm)とリンの吸収端(0.58nm)に近く、これらの元素の同定に有用であることが示された。

#### (3) 軟X線位相差顕微鏡光学系の構築

照明用および結像用にそれぞれウォルターミラーを用いた軟X線顕微鏡光学系(レーザープラズマ波長3nm)を組み立て、位相差顕微鏡

を試作した。通常の光学系では照明ミラーの開口はすべて使用するが、位相差光学系では開口の一部のみ使用し、直接光と回折光を分離しやすくした。結像ミラー後方の直接光(0次光)に位相板(3 $\mu$ m厚)を挿入し、直径2.8 $\mu$ mのポリスチレンラテックス球の位相差像を得た。

#### (4) 時間分割蛍光X線顕微鏡の構築

硫酸銅の電気分解によって生じる銅の析出の様子を、ウォルターミラーを用いた結像型蛍光X線顕微鏡で観察した。十分な観察強度を得るために光源としてはKEK放射光の白色X線(4-20keV)を利用した。1回の露光時間はおおよそ80秒、撮影間隔は150秒で行った。銅析出の経時変化が数分単位で確認できた。

#### (5) 蛍光X線ホトンカウンティングと3次元画像再構成

2次元CCDカメラホトンカウンティングによるエネルギー分解画像を3次元元素マッピングに応用した。光学系には倍率10倍のウォルターミラーを用い、波長0.1nmのX線まで結像可能な蛍光X線顕微鏡を実験室系の電子線励起回転ターゲットX線発生装置を利用して構築した。実験では鉄とニッケルを含む線状物体の蛍光X線像(波長、鉄:0.19nm、ニッケル:0.17nm)を撮影し、それぞれの元素が識別できる3次元画像を得た。測定の撮影条件は0.1秒1コマで1000枚分の重ね合わせ画像を1投影像とし、50投影像から3次元再構成像を作成した。

#### (6) 生物試料の観察

特定の蛍光物質を細胞内に導入すると特定物質部位が励起光によって発光する。この関係はたんぱく質や核酸の分布を知るには有効な手段である。軟X線顕微鏡の高分解能力と蛍光

顕微鏡の特定物質識別能を併せ持つ共軸顕微鏡光学系を構築し、その性能を評価した。

本研究で用いる斜入射X線光学系は、蛍光に対しても同一の照明光学系・試料位置・対物光学系が利用できる。測定対象の核酸位置からの発光を促すために蛍光物質としてDAPIを用いた。試料として鶏の赤血球および鮭の精巣から抽出したDNAを蛍光と軟X線（波長3nm）で観察した。光学系として透過型と落射（反射）型を採用した結果、透過型に比べ落射型の方が感度が高く、蛍光の観察が容易に行え、対応した位置の軟X線顕微鏡像が得られた。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計7件）

- ①Akihisa Takeuchi, Yasuko Terada, Yoshio Suzuki, Kentaro Uesugi, Sadao Aoki, Confocal full-field X-ray microscope for novel three-dimensional X-ray imaging, J. Synchrotron Radiation, 査読有, 16巻, 2009, 616–621
- ②Norio Watanabe, Masato Hoshino, Kazuyuki Yamamoto, Sadao Aoki, Akihisa Takeuchi, Yoshio Suzuki, X-ray phase micro-tomography using an interference microscope with zone plates, J. Phys. Conference Series, 査読無, 186巻, 2009, 012021 (3pages)
- ③Norio Watanabe, Masato Hoshino, Kazuyuki Yamamoto, Sadao Aoki, Akihisa Takeuchi, Yoshio Suzuki, X-ray fluorescence micro-tomography and laminography using an X-ray scanning microscope, J. Phys. Conference Series,

査読無, 186巻, 2009, 012029 (3pages)

- ④Masato Hoshino, Sadao Aoki, Three-dimensional observation of biological specimens using a laser plasma soft X-ray microscope, J. Phys. Conference Series, 査読無, 186巻, 2009, 012029 (3pages)
- ⑤Masato Hoshino, Sadao Aoki, Laboratory-Scale Soft X-ray Imaging Microtomography Using Wolter Mirror Optics, Appl. Phys. Express, 査読有, 1巻, 2008, 067005 (3pages)
- ⑥Takuji Ohigashi, Tatsuya Aota, Norio Watanabe, Hidekazu Takano, Hiroki Yokosuka, Sadao Aoki, Time-Lapse Observation of Electrolysis Of Copper Sulfate with a Full-Field X-ray Fluorescence Imaging Microscope, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, 47巻, 2008, 4742–4745
- ⑦Masato Hoshino, Toyooki Ishino, Takashi Namiki, Norinobu Yamada, Norio Watanabe, Sadao Aoki, Application of a charge-coupled device Photon-counting technique to three-dimensional element analysis of a plant seed(alfalfa) using a full-field x-ray fluorescence imaging microscope, Rev. Sci. Instrum., 査読有, 7巻, 2007 073706 1–7

〔学会発表〕（計9件）

- ①渡辺紀生、笹谷智隆、今井祐介、岩田俊治、座間啓介、青木貞雄、フーコーナイフエッジを用いたX線顕微鏡に

- よる位相物体の観察、第57回応用物理学会、  
2010年3月18日、東海大学湘南キャンパス
- ②鬼木崇、今井祐介、青木貞雄、渡辺紀生、  
実験室系ホトンカウンティング結像型蛍光X  
線分析顕微鏡、第10回X線結像光学シンポジ  
ウム、2009年11月6日、つくば国際会議場
- ③笹谷智隆、横須賀泰輝、青木貞雄、山口直洋、  
100ピコ秒パルスレーザーを利用した短波長  
軟X線光源の研究、第10回X線結像光学シン  
ポジウム、2009年11月6日、つくば国際会議場
- ④渡辺紀生、笹谷智隆、青木貞雄、竹内晃久、  
鈴木芳生、硬X線顕微鏡像による生物試料の  
位相マイクロトモグラフィー、第10回X線結  
像光学シンポジウム、2009年11月6日、つくば  
国際会議場
- ⑤渡辺紀生、鬼木崇、笹谷智隆、青木貞雄、  
竹内晃久、鈴木芳生、  
硬X線干渉顕微鏡像による軟骨細胞の位相マ  
イクロトモグラフィー、第56回応用物理学会、  
2009年3月30日、筑波大学
- ⑥Sadao Aoki, Masato Hoshino and Norio  
Watanabe,  
Recent development of Zernike phase  
contrast X-ray microscopy and  
microtomography, 9<sup>th</sup> International  
Conference on X-Ray Microscopy,  
2008年7月24日, スイス, チューリッヒ
- ⑦星野真人、青木貞雄、  
レーザープラズマ軟X線マイクロトモグラフ  
ィー、第9回X線結像光学シンポジウム、  
2007年11月2日、中部大学名古屋キャンパス
- ⑧星野真人、渡辺紀生、青木貞雄、  
結像型3次元蛍光X線マイクロトモグラフ  
ィー、第9回X線結像光学シンポジウム、  
2007年11月2日、中部大学名古屋キャンパス
- ⑨青木貞雄、星野真人、渡辺紀生、新井健太郎、

早野秀昭、小貫貴宏、佐藤隆二、中山裕俊、  
ツェルニケ型硬X線位相差顕微鏡のマイク  
ロトモグラフィーへの応用、第9回X線結像光学  
シンポジウム、2007年11月2日、中部大学名古  
屋キャンパス

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-aokilab.bk.tsukuba.ac.jp/>

[http://www.u.phys.nagoya-u.ac.jp/XI0/XI0-i  
ndex.html](http://www.u.phys.nagoya-u.ac.jp/XI0/XI0-index.html)

[http://www.bk.tsukuba.ac.jp/~makimura/X-ra  
yImaging/](http://www.bk.tsukuba.ac.jp/~makimura/X-rayImaging/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青木 貞雄 (AOKI SADA0)

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・教授

研究者番号：50016804

### (2) 研究分担者

渡辺 紀生 (WATANABE NORIO)

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師

研究者番号：80241793